

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006298

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-107669
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 1 0 7 6 6 9

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
J P 2 0 0 4 - 1 0 7 6 6 9
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

出 願 人
Applicant(s): 中 外 製 薬 株 式 会 社

2 0 0 5 年 4 月 2 7 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 C1-A0326
【提出日】 平成16年 3月31日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都世田谷市下馬4丁目16番5号
 【氏名】 児玉龍彦
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
 【氏名】 山田良樹
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
 【氏名】 鎌田宣夫
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
 【氏名】 寺社下浩一
【特許出願人】
 【識別番号】 000003311
 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0216136

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物。

【請求項 2】

可溶型蛋白質をコードした遺伝子が外来から導入されたトランスジェニック動物からなる、請求項 1 記載の非ヒト動物。

【請求項 3】

可溶型蛋白質をコードした遺伝子が外来から導入されたトランスジェニック動物の子孫である、請求項 2 記載の非ヒト動物。

【請求項 4】

膜蛋白質がウイルス由来である、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の非ヒト動物。

【請求項 5】

ウイルスがバキュロウイルスである、請求項 4 に記載の非ヒト動物。

【請求項 6】

膜蛋白質が gp64 である、請求項 5 記載の非ヒト動物。

【請求項 7】

可溶型蛋白質が膜貫通領域を欠損した gp64 である、請求項 6 記載の非ヒト動物。

【請求項 8】

可溶型蛋白質が gp64 の細胞外領域からなる、請求項 6 記載の非ヒト動物。

【請求項 9】

非ヒト動物がマウスである、請求項 1 ～ 8 のいずれかに記載の非ヒト動物。

【請求項 10】

雄が繁殖能を有する、請求項 6 ～ 9 のいずれかに記載の非ヒト動物。

【請求項 11】

請求項 1 ～ 10 のいずれかに記載の非ヒト動物を、標的抗原を含有する免疫原で免疫する工程、

前記標的抗原に対する抗体または抗体をコードした遺伝子を取得する工程を含む、抗体作製方法。

【請求項 12】

免疫原がウイルス粒子またはその一部である、請求項 11 記載の抗体作製方法。

【請求項 13】

ウイルスがバキュロウイルスである、請求項 12 記載の抗体作製方法。

【請求項 14】

標的抗原が膜蛋白質である、請求項 11 ～ 13 のいずれかに記載の抗体作製方法。

【請求項 15】

請求項 1 ～ 10 記載の非ヒト動物を含む、抗体作製システム。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗体作製用非ヒト動物およびこれを用いた抗体作製方法およびシステム

【技術分野】

【0001】

本発明は、標的抗原以外に背景抗原を含む免疫原で動物を免疫して標的抗原に対する特異抗体を作製する抗体作製システム等に関し、特に免疫動物に膜蛋白質からなる背景抗原に対する免疫寛容を誘導するために、免疫動物に膜蛋白質の可溶性蛋白質をコードする遺伝子を保持させたシステム等に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体の作製に必要な標的抗原の発現、精製が困難な場合、抗体は作製することが極めて困難である。膜タンパクではこの傾向が顕著である。そこで、抗原タンパクをバキュロウィルスに属する *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) の膜表面に発現させる事により、7回膜貫通タンパクなど発現や精製が困難なタンパクを抗原として利用する手法が開発されている (非特許文献1)。

【0003】

しかしながら、バキュロウィルス発現系は膜タンパク質を含め種々のタンパク質の発現系として有用であるが、バキュロウィルスの表面には膜タンパク質 gp64 (非特許文献2、3) が多数存在し、これがバキュロウィルス発現系による発現産物に混在する。gp64は分子量 64 kDaの出芽ウィルス表面の主要な構成成分であり、低pHにおけるエンベロープの融合に関与するタンパクである事が知られている。このgp64は、ヒト由来抗原タンパクと比較し非自己として認識され易く、免疫原中にgp64が混在すると、標的抗原よりもgp64に対する抗体が産生され易い。そのため、バキュロウィルス発現系を用いて免疫原を調製した場合、抗原タンパクに対する特異抗体の産生・取得は困難である (非特許文献4)。この問題を解決する手段として、本願発明者らにより gp64トランスジェニックマウス (以下、「Tgm」という) が創出された。このTgm (以下、「gp64Tgm」という) は、免疫系が発達する以前から内在性遺伝子と同様に外来性の gp64を保持している。そのため、このTgmは、内因性遺伝子と同様に gp64に対し免疫寛容を示し、バキュロウィルスで発現させた標的抗原タンパクを認識し有利に特異抗体を産生させることが可能となる (特許文献1)。

【0004】

しかしながら、gp64Tgmは精巣が発達せず、精子が形成されないという表現型を示すものだった。したがって、系統の維持は雌に限定され、系統の維持はできるものの効率的な繁殖ができなく、また、他の遺伝子欠損マウスあるいはTgmとの交配による交雑種を作製する際にも、利用しにくい面があった。

【特許文献1】 W0 03/104453

【非特許文献1】 *Biotechnology*, vol.13, 1079-84 1995.

【非特許文献2】 *Journal of Immunological Methods*, vol.234, 123-135 2000

【非特許文献3】 *Journal of Virology*, vol.70, No.7, 4607-4616 1996

【非特許文献4】 *Journal of Virology*, vol.69, No.4, 2583-2595 1995

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

上述したとおり、上記 gp64Tgmはバキュロウィルスを用いて発現させた蛋白質に対する特異的な抗体を産生させるための免疫動物として有益であるが、不妊という問題があった。そこで、このような外来の膜蛋白質をトランスジェニック動物で発現・維持することを可能にするために、精巣の発達抑制等のような好ましくない表現型を持たない一層有益なTgmの創出、及びこの新規なTgmを用いた抗体作製方法等を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本願発明者らは、精巣発達抑制の原因が精巣内の細胞膜上への gp64の発現によると予想

した。そこで、gp64（全長）の膜貫通領域を削除した可溶型gp64（以下、「sgp64」という）をpCAGGSベクター（Gene, vol.108, 193-200 1991）につなぎsgp64発現ベクター（以下、「pCAG-sgp64ベクター」という）を構築した。これをマウスに導入して、sgp64Tgmを作製したところ、雄Tgmも繁殖能を保持し、従来の精巢の発達抑制という問題を解消することに成功した。さらに、これらsgp64Tgmおよびコントロールの非トランスジェニックマウスを出芽バキュロウイルスで免疫し、血清を採取し、gp64に対する免疫寛容の有無を調べた。その結果、コントロールの非トランスジェニックマウスでは、gp64に対する抗体が産生されていたが、sgp64Tgmではgp64に対する抗体はほとんど検出されなかった。すなわち、本願発明者らは、sgp64を用いることにより従来のgp64Tgmで見られた雄の不妊を回避でき、バキュロウイルスに発現させた抗原を用いた抗体作製にとって有効なトランスジェニックマウスを確立することができた。本願発明は、これら知見に基づくものであり、具体的には以下の通りである。

【0007】

- 〔1〕 膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物。
- 〔2〕 可溶型蛋白質をコードした遺伝子が外来から導入されたトランスジェニック動物からなる、〔1〕記載の非ヒト動物。
- 〔3〕 可溶型蛋白質をコードした遺伝子が外来から導入されたトランスジェニック動物の子孫である、〔2〕記載の非ヒト動物。
- 〔4〕 膜蛋白質がウイルス由来である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の非ヒト動物。
- 〔5〕 ウイルスがバキュロウイルスである、〔4〕に記載の非ヒト動物。
- 〔6〕 膜蛋白質がgp64である、〔5〕記載の非ヒト動物。
- 〔7〕 可溶型蛋白質が膜貫通領域を欠損したgp64である、〔6〕記載の非ヒト動物。
- 〔8〕 可溶型蛋白質がgp64の細胞外領域からなる、〔6〕記載の非ヒト動物。
- 〔9〕 非ヒト動物がマウスである、〔1〕～〔8〕のいずれかに記載の非ヒト動物。
- 〔10〕 雄が繁殖能を有する、〔6〕～〔9〕のいずれかに記載の非ヒト動物。
- 〔11〕 〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の非ヒト動物を、標的抗原を含有する免疫原で免疫する工程、

前記標的抗原に対する抗体または抗体をコードした遺伝子を取得する工程を含む、抗体作製方法。

- 〔12〕 免疫原がウイルス粒子またはその一部である、〔11〕記載の抗体作製方法。
- 〔13〕 ウイルスがバキュロウイルスである、〔12〕記載の抗体作製方法。
- 〔14〕 標的抗原が膜蛋白質である、〔11〕～〔13〕のいずれかに記載の抗体作製方法。
- 〔15〕 〔1〕～〔10〕記載の非ヒト動物を含む抗体作製システム。

【0008】

上記本発明の理解を容易にするために、前提となるいくつかの用語の意味を説明する。

本発明において、「標的抗原」とは、目的とする抗体が認識する抗原を言う。標的抗原は、抗原性を有する任意の物質から選択することができる。具体的には、蛋白質、糖鎖、脂質、あるいは無機物質などが抗原性を示す物質として知られている。標的抗原は、天然に存在するものであることもできるし、人工的に合成されたものであっても良い。人工的に合成されたものには、遺伝子工学技術を利用して作製された組み換え蛋白質や、化学的に合成された様々な有機物質が含まれる。

【0009】

「背景抗原(background antigens)」とは、抗体の産生を希望しない抗原決定基を有する物質、またはその抗原決定基そのものを言う。たとえば、標的抗原に混在する標的抗原以外の抗原性物質は、背景抗原である。代表的な背景抗原は、粗精製状態の標的抗原に混在する蛋白質である。より具体的には、組み換え蛋白質に含まれる宿主に由来する蛋白質を、背景抗原として示すことができる。背景抗原とは、目的とする抗体産生を誘導するための免疫原に含まれ、目的としない抗体の産生を誘導する原因となる抗原と定義すること

もできる。背景抗原は、一般には標的抗原とは別物質の抗原性物質を指すものと考えられるが、本発明ではこれに限定されず標的抗原と同じ分子上に存在する抗原決定基を背景抗原に含めることができる。例えば、標的抗原と同じ分子上に抗体の産生を希望しない抗原決定基がある場合、該抗原決定基は本発明における背景抗原に含まれる。

【0010】

「免疫寛容(immunotolerance)」とは、免疫寛容の対象となる抗原(寛容原;immunotolerance antigens)に対して特異的に免疫応答が失われるか、または低下することを言う。正常な免疫動物の寛容原に対する免疫応答に対して、ある個体の同じ寛容原に対する免疫応答が低下しているとき、この個体は寛容原に対する免疫寛容を有すると言う。たとえば寛容原を投与した場合に産生される寛容原に対する抗体の量が減少していれば、免疫応答が低下していると見なすことができる。

【発明の効果】

【0011】

本発明により、従来のバキュロウィルスの膜蛋白質gp64遺伝子が導入されたトランスジェニック動物における雄の不妊という問題が解消された新たなトランスジェニック動物が提供された。これはgp64という膜蛋白質をコードする遺伝子のうち、膜貫通領域をコードする配列を欠損等させて可溶型gp64を発現(つまりgp64を細胞膜外に発現)させることにより、上記問題の解決を図ることができた。したがって、本発明のように、膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物では、膜蛋白質全長をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物における好ましくない表現型、例えば、雄不妊などの好ましくない特性の出現を回避することが可能となる。

【0012】

また、上記の通り、可溶型蛋白質をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物では、膜蛋白質の全長をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物と同様に、膜蛋白質に対する免疫寛容が誘導されることが確認されている。したがって、免疫原中に背景抗原として膜蛋白質が混在しているような場合には、当該膜蛋白質の膜貫通領域等を欠損させた可溶型蛋白質をコードする遺伝子を外来遺伝子として有するトランスジェニック動物を免疫動物として用いることが有利となる。つまり、当該免疫動物は背景抗原の膜蛋白質に対する免疫寛容が誘導され、目的の抗原に対する特異的な抗体が有利に産生される上に、膜蛋白質全長が導入されたトランスジェニック動物の好ましくない表現型の出現が回避されるため、抗体作成用のシステムとして一層利用し易いものとなる。

【0013】

また、本発明の動物を用いて作製された抗体は、背景抗原に対する抗体の混在がないか又は極めて少ないため、高純度の抗体として提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、標的抗原以外に背景抗原として膜タンパク質が混在している免疫原を用いて、標的抗原に対する抗体を作製する場合に有益なトランスジェニック動物を提供するとともに、このトランスジェニック動物を用いた抗体作製方法及びシステムを提供する。

【0015】

本発明では、上述した通り、背景抗原は膜蛋白質である。背景抗原として膜蛋白質が混在する場合としては、例えば、標的抗原を調製に用いた宿主生物由来の膜蛋白質が混在する場合や、発現系に使用されたウイルス由来の膜蛋白質が混在する場合などが挙げられる。たとえば、バキュロウィルス発現系を用いて標的抗原として膜蛋白質を調製する場合のように、標的抗原がウイルスベクター由来の膜蛋白質とともに発現される場合には、背景抗原として膜蛋白質が多量に混在する。

【0016】

ここで、「膜蛋白質」とは、通常、生体膜を構成している蛋白質を意味し、例えば、生体膜の内部に埋もれている蛋白質を意味するが、本発明においてはGPIアンカー型蛋白質などのようにアンカーなどを介して細胞膜面につながれている蛋白質も含まれる。また、

ウイルス由来の膜蛋白質は、通常、出芽ウイルスの外被を構成する蛋白質を言う。一例として、バキュロウイルスであれば、gp64と呼ばれる蛋白質が膜蛋白質に相当する。このような膜蛋白質の構造の多くは、細胞膜内に埋もれた領域（細胞膜貫通領域）、細胞膜の外に露出している領域（細胞外領域）、細胞膜の内側に位置する領域（細胞内領域）を有する。また、膜蛋白質を機能的にみると、膜を構成する蛋白質、受容体、輸送体などのシグナル伝達等に関与する蛋白質や、膜酵素など特異的な反応を行うものなどが含まれる。そのため、こうした外来の膜蛋白質を免疫動物内に導入した場合、免疫動物のいずれかの生体膜等で発現して、免疫寛容を誘導するだけではなく、その他の好ましくない特性を付与することがある。その例として、バキュロウイルス由来の膜蛋白質gp64が導入されたマウスでは、雄の不妊という問題が生じる。

【0017】

本発明の抗体作製システムの非ヒト動物では、上記背景抗原として免疫原中に混在し得るウイルス由来の膜蛋白質に対して免疫寛容が誘導される。例えば、バキュロウイルス発現系を用いて調製した免疫原を用いる場合には、バキュロウイルス由来膜蛋白質gp64に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物が免疫動物として使用される。免疫寛容の誘導方法として、従来では、背景抗原である膜蛋白質全長をコードする遺伝子を免疫動物に保持させる方法が開発されていたが、本発明では、可溶化された膜蛋白質（以下「可溶型蛋白質」）をコードする遺伝子を非ヒト動物に保持させる。

【0018】

「可溶型蛋白質」とは、本来、生体膜上で発現している膜蛋白質（不溶性蛋白質）を生体膜外で発現し得るように改変した蛋白質を指す。上述した通り、膜タンパク質には、シグナル伝達に関与し得るような受容体や輸送体、膜酵素などの生体内のスイッチのような機能を担うものが存在するため、こうした膜蛋白質が免疫動物の生体膜で発現した場合に免疫動物に背景抗原に対する免疫寛容を誘導する以外に好ましくない特性を付与し得ることに鑑みて、本発明では、膜蛋白質を生体膜外で発現させ得るように可溶型としている。また、膜蛋白質全長を用い生体膜という局在した部位で発現させる従来の方法に比して、本発明では膜蛋白質を可溶型として全身的な細胞質で発現可能となるため、より免疫寛容の誘導効率を高めることが期待できる。

【0019】

膜蛋白質を可溶型とする改変として、本発明では遺伝子工学的に膜蛋白質をコードする遺伝子を改変する方法が用いられる。遺伝子工学的な膜蛋白質の可溶化方法として、膜貫通領域を欠損させることが挙げられる。膜貫通領域の欠損の程度は、膜蛋白質を細胞外で発現させ得る限り、膜貫通領域の一部の欠損であってもよく、膜貫通領域全体の欠損であってもよい。膜貫通領域は、一般に20-30アミノ酸よりなる α ヘリックス構造をとるため、こうした構造に変化を与えるような変異を加えることにより、可溶型としてもよい。

【0020】

また、膜蛋白質を可溶型蛋白質に改変する場合、膜貫通領域以外の領域として細胞内領域と細胞外領域とがあるが細胞内領域は備えている必要はなく、免疫寛容を誘導し得る抗原決定基を備えた細胞外領域のみに限定してもよい。さらに細胞外領域としても免疫寛容を誘導し得る範囲、例えば、抗原性を保持し、膜蛋白質に対する免疫寛容を誘導し得る抗原決定基を備えた範囲に限定することもできる。

【0021】

上記可溶型蛋白質は、膜蛋白質等から膜貫通領域などを欠損させる以外に、他のペプチドなど付加または挿入したキメラ蛋白質から構成してもよい。キメラ蛋白質に付加・挿入するペプチドとして、他の背景抗原（この「他の背景抗原」は、膜蛋白質であるか否かを問わない）の抗原決定基とすることもできる。このように一つの蛋白質に複数の背景抗原に対する抗原決定基を備えることにより、複数の背景抗原に対する免疫寛容を誘導することもできる。

【0022】

可溶型蛋白質の構築例として、バキュロウイルス膜蛋白質gp64の場合を例に挙げ説明す

る。gp64は配列番号1記載のDNA配列にコードされ、このうち膜貫通領域は1465塩基から1515塩基に、細胞外領域は1塩基から1464塩基にコードされている。したがって、gp64を可溶型とするには、上記膜貫通領域を欠失させるかまたは α ヘリックス構造を担うアミノ酸をコードする配列を他のアミノ酸に置換させることなどが挙げられる。また、上記細胞外領域については全体を用いてもよく、また、細胞外領域のうち、gp64の構造上表面に露出されている等の抗原となり得る範囲に限定してもよい。gp64の可溶型をコードする配列の一例を配列番号3に示す。また、この可溶型gp64をコードする配列の調製は、後述する実施例1に従って実施することができる。

【0023】

本発明では、こうした可溶型蛋白質をコードした遺伝子を非ヒト動物に保持させ、免疫寛容を誘導している。本発明に用いることができる非ヒト動物としては、例えば、サル、ブタ、イヌ、ラット、マウス、ウサギ、などを挙げることができる。たとえば、ラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類は、好ましい非ヒト動物である。トランスジェニック動物とすることで免疫寛容を誘導するには、げっ歯類のような、成熟が早く、遺伝子操作の手法が確立されている非ヒト動物が有利である。特にマウスは、これらの条件を高い水準で満たすことができる非ヒト動物である。

【0024】

上記可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持する非ヒト動物は、外来遺伝子として可溶型蛋白質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック動物を作製することにより得ることができる。例えば、トランスジェニックマウスは公知の方法に従って作製することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384(1980))。具体的には、目的の遺伝子を哺乳動物の全能細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させる。得られた個体のうち、体細胞および生殖細胞中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって、目的とするトランスジェニックマウスを作製することができる。遺伝子を導入する全能細胞としては、受精卵や初期胚のほか、多分化能を有するES細胞のような培養細胞などが挙げられる。より具体的には、後述する実施例記載の方法により作製できる。

【0025】

また、本発明の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持する非ヒト動物は、上記トランスジェニック動物の子孫であってもよい。トランスジェニック動物が一旦樹立されれば、通常、導入された遺伝子による形質(本発明では免疫寛容の形質)を子孫に伝えることは容易である。しかし、従来開発されているバキュロウイルスgp64が導入されたトランスジェニック動物では雄の不妊の問題が生じ、その免疫寛容の形質を効率よく子孫に反映させることが困難であった。一方、本発明では、膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作製することにより、膜タンパク質全長をコードした遺伝子が導入されたトランスジェニック動物における好ましくない特性の発現が回避された。その一例として、バキュロウイルスgp64の可溶型蛋白質をコードする遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作製することにより、雄の繁殖能が維持され、効率的な繁殖により形質を子孫に伝えることが容易になっている。可溶型gp64を保持したトランスジェニック動物は効率良く繁殖することができ、その子孫も免疫寛容の形質を保持しているため、後述する抗体作製等の免疫動物として有用となる。このように膜蛋白質全長ではなく、可溶型蛋白質をコードした遺伝子を非ヒト動物に保持させることにより、当該膜蛋白質に対する免疫寛容が誘導された免疫動物をより広く利用しやすいものとすることができる。

【0026】

本発明の膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物は、標的抗原蛋白を欠失させた遺伝子欠損動物(いわゆるノックアウト動物)を基に作製してもよい。また、蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物は背景抗原発現トランスジェニック動物をこうした標的抗原蛋白ノックアウト動物と交配してもよい。これらにより、背景抗原発現および標的抗原蛋白質欠損という形質を非ヒト動物に備えさせることもできる。このように両形質を保持した動物では、背景抗原に対しては免疫寛容が誘導され、一方、標的抗原は先天的に保有していないため、標的抗原をより異物として認

識され易く、目的の抗体を効率よく得ることができる。

【0027】

なお、本発明の背景抗原に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物において、免疫原に含まれる可能性のある全ての背景抗原に対して、抗体の産生が抑制されることは必ずしも重要ではない。標的抗原に対する抗体の産生と取得が妨げられない範囲であれば、背景抗原を認識する抗体の産生は許容される。したがって、たとえば、主要な背景抗原に対してのみ免疫寛容が誘導された免疫動物であっても、本発明の好ましい免疫動物として利用することができる。

【0028】

本発明は上記膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を利用した抗体作製方法に関する。

上記膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物に標的抗原以外に背景抗原として当該膜蛋白質を含む免疫原を免疫する工程と、前記標的抗原に対する抗体または抗体をコードした遺伝子を取得する工程とが含まれる。

【0029】

本発明における免疫原には、標的抗原以外に背景抗原として少なくとも膜蛋白質が含まれる。一般に、標的抗原は生物材料に由来する物質からなる。生物材料は、様々な成分を含む複雑な混合物である。したがって、標的抗原は、通常、多様な混合物を原料として調製されている。その結果、標的抗原を高度に精製することは困難である。言い換えれば、標的抗原を大量に、かつ高度に精製するには、多くの手間と時間を要する。本発明では、このような標的抗原以外に背景抗原として膜蛋白質が混在する免疫原を用いて、効率よく標的抗原に対する抗体を取得し得る方法が提供される。

【0030】

具体的には、本発明の免疫原として、背景抗原として膜蛋白質が混在し得る細胞、細胞培養液、細胞溶解物、ウイルス、あるいは未精製の抗原などを挙げることができる。細胞やウイルスを用いる場合には、目的の抗原をコードする遺伝子を遺伝子組み換え技術により細胞やウイルスに導入して、目的の抗原を人為的に発現させたものを用いることができる。細胞やウイルスなどは、その全体のみならず、その一部分のみを免疫原として用いることもできる。また、細胞膜やウイルスエンベロープ部分のみを免疫原として用いることも可能である。こうした細胞やウイルス全体、その一部として細胞膜やウイルスエンベロープを免疫原として用いた場合、細胞膜やウイルスエンベロープに含まれる膜蛋白質が背景抗原として混在する。

【0031】

本発明における望ましい免疫原の一つに、ウイルス粒子、またはその一部を示すことができる。ウイルスは、核酸と限られた蛋白質や糖等の比較的単純な成分で構成されている。したがって、標的抗原の取得を妨害する背景抗原の種類も限られる。ウイルス粒子、その一部中の標的抗原の取得を妨害する背景抗原として、粒子表面の膜蛋白質が挙げられる。粒子表面は免疫動物に投与された場合には、抗原性が高く、抗体産生を誘導し易い。従って、この少ない背景抗原の中でも、粒子表面などの膜蛋白質である背景抗原に対して免疫動物に免疫寛容を誘導すれば、本発明に基づく抗体の作製方法をより有利に実施することができる。

【0032】

本発明において、免疫原として用いることができるウイルスの中で、好適なものの一つにバキュロウイルス(Baculovirus)がある。バキュロウイルスは、2本鎖DNAからなるゲノムがキャプシド蛋白質に覆われた構造を有する昆虫ウイルスである。中でもバキュロウイルスの一種である核多角体病ウイルス(NPV)を利用した発現系は、外来性遺伝子の発現システムとして有用である。NPVは強力なプロモーター活性を有している。したがって、NPVのゲノムに外来性の遺伝子を組み込むことで、任意の蛋白質を大量に生産させることができる。具体的には、ポリヘドリンと呼ばれる蛋白質をコードする遺伝子を、任意の遺伝子に組み換えることによって、外来性の遺伝子の強力な発現が誘導される。

【0033】

上記バキュロウイルス発現系で発現させ得る外来性遺伝子には、特に限定はなく任意の遺伝子が用いられるが、バキュロウイルスは膜蛋白質を発現させるための好適な系として利用し得ることから、好適な遺伝子の例としては膜蛋白質をコードする遺伝子が挙げられる。バキュロウイルス発現系では、バキュロウイルスの膜蛋白質とともに目的の膜蛋白質を、その構造を維持した状態で発現させることができる。また、発現生成物を出芽ウイルスとして容易に回収できることも、バキュロウイルス発現系の利点である。

【0034】

バキュロウイルスを用いて標的抗原である膜蛋白質を発現させる方法としては、例えば、W098/46777及びLoiselら(T.P.Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))に記載の出芽バキュロウイルスを用いた方法が挙げられる。より詳細には、外来性蛋白質をコードする遺伝子を含む昆虫細胞用の組換えベクターを作製し、バキュロウイルスDNAと共にSf9等の昆虫細胞へ導入する。すると、組換えベクターにコードされた外来性の膜蛋白質は、感染細胞が死滅する前に感染細胞より細胞外に放出される成熟ウイルス粒子(ピリオン)上に発現され、外来性蛋白質を発現する組換えウイルスを得ることができる。

【0035】

本発明において、出芽ウイルスとは出芽(budding)により感染細胞から放出されるウイルスのことである。一般に細胞膜を被ったウイルスは細胞が破壊されていない状態でも当該ウイルスに感染した細胞から発芽し、継続的に放出されるのに対し、膜を被らないアデノウイルスや、核膜を被ったヘルペスウイルスは細胞が破壊された時に一斉に放出される。本発明においては、特に出芽ウイルスが好ましい。また、本発明において組換えウイルスを感染させる宿主は、当業者であれば、用いるウイルスの種類に応じて、ウイルスの増殖を可能ならしめる宿主を適宜選択することができる。例えば、バキュロウイルスを用いる場合、Sf9等の昆虫細胞の使用が考えられる。一般に、バキュロウイルス-昆虫細胞を用いたタンパク質発現系は、哺乳動物細胞と同様に脂肪酸アセチル化及び糖鎖付加等の翻訳と同時にまたは翻訳後の修飾が行われること、並びに、哺乳動物細胞系よりも異種タンパク質の発現レベルが高いこと(Luckow V. A. and Summers M. D., Virol. 167: 56 (1988))から有利な系であると考えられている。

【0036】

標的抗原である外来性蛋白質を発現しているウイルスは、例えば、外来性蛋白質をコードする遺伝子を含む組換えウイルスを感染させた宿主を培養することによって得ることができる。または、上述のW098/46777及びLoiselら(T.P.Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))の方法の様に、外来性蛋白質をコードする組換えベクターをバキュロウイルスと共に昆虫細胞に導入することにより、細胞外へ放出されるバキュロウイルスの膜上に外来性蛋白質を発現させることもできる。また、Strehlowら(D.Strehlow et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 97: 4209-4214(2000))の方法のように、外来性蛋白質をコードする遺伝子を導入したMoloneyウイルス由来ベクターより作製した組換えウイルスをPA317等のパッケージング細胞に感染させることにより、細胞外へ放出されるMoloney murine leukemiaウイルスの膜上に外来性蛋白質を発現させることができる。これらは外来性蛋白質を発現させるウイルスの一例であり、本発明の免疫原に用いることができる外来性蛋白質を発現しているウイルスは、これらの方法により調製されたものに限定されない。

【0037】

上述のようにして調製された組換えウイルスは、必要に応じて公知の手法により精製することができる。例えば、増加密度勾配遠心法(augment density gradient centrifugation)(Albrechtsen et al., J.Virological Methods 28: 245-256 (1990); Hewish et al., J.Virological Methods 7: 223-228 (1983))、サイズ排除(size exclusion)クロマトグラフィー(Hjorth and Mereno-Lopez, J.Virological Methods 5: 151-158 (1982); Crooks et al., J.Chrom. 502: 59-68 (1990); Mento S.J. (Viagene, Inc.) 1994 Williamsburg Bioprocessing Conference)、モノクローナル抗体及びフコース硫酸含有多糖類等を利用

したアフィニティークロマトグラフィー(Najayou et al., J.Virological Methods 32: 67-77 (1991); Diaco et al., J.Gen.Virol. 67: 345-351 (1986); Fowler, J.Virological Methods 11: 59-74 (1986); 特再表97/032010)、DEAEイオン交換クロマトグラフィー(Haruna et al., Virology 13: 264-267 (1961))等がウイルスを精製する方法として知られている。したがって、上述の方法、または、これらの方法を組み合わせて精製しても良い。

【0038】

上記のように調製された免疫原を用いて、免疫動物を免疫する。本発明で用いられる免疫動物は、免疫原中に含まれる背景抗原である膜蛋白質に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物が用いられる。背景抗原の膜蛋白質に対する免疫寛容の誘導は、上述した通り、当該膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を免疫動物に保持させることにより実施することができる。

【0039】

上記において膜蛋白質調製において好適な発現系として示したバキュロウイルス発現系を免疫原調整に用いた場合には、免疫動物として、gp64可溶型をコードした遺伝子を保持させることによりgp64に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物を用いることが好ましい。ここで免疫動物としてgp64全長をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を用いることもできるが、雌雄共に繁殖能を有することから効率的に生産され広く利用可能な可溶型gp64トランスジェニック動物などを用いることが好ましい。従って、本発明の好適な実施形態として、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を免疫動物に用い、標的抗原として膜蛋白質を発現させた出芽バキュロウイルスを免疫原として免疫を行うことが挙げられる。

【0040】

本発明の抗体作製方法によれば、背景抗原として膜蛋白質の混在による標的抗原に対する抗体取得の妨害作用を抑制することができる。したがって、本発明を用いれば、バキュロウイルス発現系の外来性蛋白質の発現システムとしての利点を、免疫原の作製においても十分に生かすことが可能となる。

【0041】

なお、免疫から抗体取得までの方法は公知の方法を用いることができる。免疫原による動物の免疫は、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、免疫原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したのに対し、所望により通常のアジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。アジュバントには、たとえばフロイント完全アジュバントが用いられる。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した免疫原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

【0042】

血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、免疫した動物の血液を採取し、血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。

【0043】

本発明の抗体作製方法にモノクローナル抗体作成方法を組み合わせてもよい。モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から抗体産生細胞を採取してクローニングする。抗体産生細胞としては、たとえば脾細胞を用いることができる。抗体産生細胞のクローニングには、細胞融合法を用いることができる。前記抗体産生細胞と融合される他方の親細胞としては、たとえば哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。より好ましくは、融合細胞(ハイブリドーマ)の選択マーカーとなる、特殊な栄養要求性や薬剤耐性を有するミエローマ細胞が挙げられる。前記抗体産生細胞とミエローマ細胞は、基本的には公知の方法に準じて細胞融合させることができる。細胞融合を利用したモノクローナル抗体の作製方法は、

たとえばミルステインらによって確立されている (Galfre, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46)。

【0044】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、選択培養液で培養することにより選択される。選択培養液は、細胞融合に用いたミエローマ細胞の特性などに応じて選択される。選択培養液としては、たとえば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）が用いられる。ハイブリドーマは、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、当該HAT培養液で培養される。通常、数日～数週間培養を継続することにより、ハイブリドーマを選択することができる。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

【0045】

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスの腹水としてモノクローナル抗体を回収することができる。腹水からモノクローナル抗体を精製することもできる。モノクローナル抗体の精製には、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、目的の抗原をカップリングしたアフィニティカラムなどを利用することができる。

【0046】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体とすることができる（例えば、Borrebæck, C. A. K. and Larrick, J. W., *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。

【0047】

さらに、本発明の抗体作成方法に抗体の改変および修飾の技術を組み合わせて、抗体断片、抗体修飾物を得ることもできる。たとえば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又は重鎖と軽鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 5879-5883) などである。抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【0048】

発明の抗体作成方法にヒト抗体への改変技術を組み合わせることもできる。ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際特許出願公開番号W0 93/12227, W0 92/03918, W0 94/02602, W0 94/25585, W0 96/34096, W0 96/33735参照）を基に背景抗原の可溶性蛋白質をコードする遺伝子を導入し、ヒト抗体作製能および背景抗原に対する免疫寛容能を保持させて、目的の抗原で免疫することで目的のヒト抗体を取得してもよい。

【0049】

また、本発明の方法により得られた抗体は、免疫動物に由来する非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体とすることができる。また免疫動物に由来する非ヒト抗体のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）および定常領域からなるヒト化抗体とすることもできる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、たとえばキメラ抗体は、免疫動物の抗体の重鎖、および軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。

【0050】

ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト化抗体は、免疫動物由来の抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) を、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

【0051】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることによりヒト化抗体を得られる (欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

【0052】

更に、免疫動物の抗体産生細胞から、抗体をコードする遺伝子を取得することができる。抗体をコードする遺伝子を取得する方法は、制限されない。たとえば、可変領域やCDRをコードする遺伝子を鋳型として、PCR法によって当該遺伝子を増幅することによって抗体をコードする遺伝子を得ることができる。抗体遺伝子をPCR法によって増幅するためのプライマーが公知である。得られた遺伝子を適当な発現系を用いて発現させることによって、目的とする抗体を製造することができる。あるいは、本発明によって得られた遺伝子を、種々の改変抗体 (ヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体、免疫動物由来の抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域に移植されたヒト化抗体) を製造するために利用することもできる。

本発明により、膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を含む抗体作製システムが提供される。

【0053】

ウイルスの発現ベクターなどを用いて免疫原を調製した場合、そのウイルス由来あるいはウイルス発現ベクターが導入された宿主細胞由来の膜蛋白質が背景抗原として混在する場合がある。この背景抗原である膜蛋白質は、標的抗原である外来性遺伝子によるものではなく、ベクターや宿主などの発現系に由来する場合がほとんどである。そのため、発現系毎に混在し得る背景抗原の膜蛋白質を同定する。そして、その膜蛋白質の可溶型蛋白質をコードした遺伝子をトランスジェニック技術により非ヒト動物に導入し、得られたトランスジェニック動物において膜蛋白質に対する免疫寛容を誘導されているかを確認する。非ヒト動物において免疫寛容が誘導されているか否かは、実施例に示したように、血清中に背景抗原である膜蛋白質に対する抗体が生成されているか否かを確認することにより行うことができる。

【0054】

上記背景抗原に対する免疫寛容の誘導が確認された非ヒト動物は、背景抗原の膜蛋白質が可溶型として発現されるため、バキュロウイルスgp64で観られたような雄における繁殖能の欠損などの好ましくない表現系の出願が回避され、広く利用可能な免疫動物として提供し得る。そのため、本発明の膜蛋白質の可溶型をコードした遺伝子を保持する免疫動物と、当該膜蛋白質が背景抗原として産生される発現系とを組み合わせることにより、効率的な抗体作製を支援し得るシステムを構築することができる。

【0055】

例えば、上述において詳述したバキュロウイルス発現系であれば、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物と組み合わせることにより、バキュロウイルス発現系の利点を抗体作製に反映させることができる。より具体的には、バキュロウイルス発現系では、gp64とともに標的抗原として所望の蛋白質、特に、膜蛋白質をその立体構造を保持し

たまま発現させることができ、この発現産物は出芽ウイルスとして容易に回収することができる。この出芽ウイルスを免疫原とし、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を免疫動物として免疫する。この可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物では、gp64に対して免疫寛容が誘導されているため、免疫原である出芽ウイルス上にgp64が多量に発現されていても、このgp64に対する抗体産生は抑制された状態で、標的抗原である膜蛋白質に対する抗体を産生させることが可能となる。従って、可溶型gp64をコードした遺伝子を保持した非ヒト動物を用いることにより、gp64が背景抗原としてバキュロウイルス上で存在している状態でも、標的抗原に対する有利に抗体産生を誘導することが可能となる。その結果、本システムにより得られる抗体は、標的抗原に対する純度の高い抗体を得ることが可能となる。

【実施例】

【0056】

【実施例1】 sgp64トランスジェニックベクターの構築

gp64遺伝子(配列番号：1、全長；1539bp)の膜貫通領域(1465塩基から1539塩基)を欠損させ細胞外領域のみを持つ遺伝子断片(可溶型gp64；1464bp、配列番号：3)をPCRにて調製した。

【0057】

具体的には、gp64の5'末端配列と制限酵素EcoRI認識配列とKozak配列を結合した5'プライマー(64F1：5'-GAATTCACCATGGTAAGCGCTATTGTT-3'、配列番号：5)とgp64の膜貫通領域直前の配列にEcoRI認識配列を5'末端接続した3'プライマー(s64R1：5'-GAATTCTCATTATACATGACCAAACATGAACGA-3'、配列番号：6)(図1)、およびテンプレートDNAとしてpCAG-gp64ベクターを用い、以下の条件でPCR(Polymerase Chain Reaction)法を行った。PCR反応溶液の組成は、10 x ExTaq buffer(TaKaRa) 5 μ L, ExTaq付属dNTPミクスチャー 4 μ L, プライマー64F1(10 μ mole/L) 1 μ L, プライマーs64R1(10 μ mole/L) 1 μ L, pCAG-gp64 (500 pg/ μ L) 1 μ L, ExTaq (5 units/ μ L, TaKaRa) 0.5 μ L, H₂O 37.5 μ Lとした。サイクル反応は、94 $^{\circ}$ Cで5分加熱した後、94 $^{\circ}$ C 15秒、57 $^{\circ}$ C 30秒および72 $^{\circ}$ C 30秒を25サイクル、その後、72 $^{\circ}$ C 7分処理し、4 $^{\circ}$ C保存とした。増幅バンドをpGEM-Teasy (Promega)にサブクローニング後、E. coli (DH5 α , TOYOBO)へトランスフォームした。T7プライマー(5'-TAATACGACTCACTATA-3'、配列番号：7)、およびSP6プライマー(5'-CATACGATTTAGGTGACACATATAG-3'、配列番号：8)を用いてコロニーPCRを行い、インサートが確認されたクロンの塩基配列をABI Prism377 DNA sequencerを用いて、BigDye Cycle Sequence kit (Applied Biosystems)とT7プライマー、あるいはSP6プライマーにより解析し、目的の遺伝子を含むクロンを確認した。このクロンからgp64を含む断片を制限酵素EcoRI処理により切り出し、制限酵素EcoRI処理したpCAGGSベクターに挿入し、E. coli (DH5 α)へトランスフォームした。gp64断片の挿入方向は、制限酵素XhoIおよびXbaI処理により得られたバンドのサイズ(約2.1kb)で判断し、pCAG-sgp64ベクターを作製した(図2)。設計通りのクロンを250 mLのLB培地を用い37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、Endofree MAXI kit (QIAGEN)を用いて精製して、プラスミド(581.6 μ g)を得た。

【0058】

【実施例2】 sgp64Tgm樹立

Tgm作製に用いるインジェクション用DNAフラグメントの調製は、pCAG-sgp64ベクターを制限酵素SalIおよびPstIで処理した後、sgp64遺伝子を含む断片(約3.7kb)を切り出し、Gel Extraction Kit (QIAGEN)により回収し、この断片を3 ng/ μ LになるようにPBS⁻で希釈することにより行った。DNAフラグメントを注入するマウス前核期胚の回収は、次のように行なった。すなわち、BALB/cA雌マウス(日本クレア)を過排卵処理(5 i.u.のeCG(セロトロピン；帝国臓器)を腹腔内投与、さらに48時間後5 i.u.のhCG(ブペローゲン；三共)を腹腔内投与した後、同系統の雄マウス(日本クレア)と交配した。翌朝、膣栓を確認した雌マウスの卵管を灌流することにより、前核期胚を回収した。DNAフラグメントの前核期胚への注入は、マイクロマニピュレーターを用いて行った(ジーンターゲティングの最新技術(洋土社)、190-207 2000)。翌日、2細胞期に発生していた胚を、偽妊娠1日目の

受容雌の左右の卵管に、各10個前後（1匹あたり20個前後）を移植した。分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し里親に哺育させた。

【0059】

上記方法に基づいて、DNAフラグメントを497個のBALB/cAマウス前核期胚へ注入し、そのうちの2細胞期胚に発生した430個を偽妊娠受容雌の卵管に移植した。その結果、66例の産仔が得られた。ここで得られた産仔について導入された遺伝子の確認を以下の通り行った。

【0060】

マウス尾を採取し、Lysis buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 0.1M NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS, Proteinase K 1mg/mL:TaKaRa)で55℃ 一晚処理した後、核酸自動分離装置 (KURABO, NA-1000P) を用いゲノムDNAを抽出し、サザンブロット法およびPCR法による導入遺伝子の確認を行った。サザンブロット法による導入遺伝子の確認は、抽出したゲノム DNA (15 μ g) を制限酵素EcoRIで処理し、アガロースゲルで泳動後、ナイロンメンブレン (Hybond N+ : Amersham) へ アルカリブロット法によりトランスファーした。プローブには、制限酵素EcoRI処理したpCAG-sgp64ベクターのsgp64を含む約1.5kbの断片を用い、³²Pでラベルした後、トランスファーしたゲノムDNAとハイブリダイズさせることによりサザンブロットを行った。ハイブリダイゼーションは、5x SSPE, 50%ホルムアミド, 5x デンハルト, 0.5 % SDSをハイブリダイゼーション溶液として用い、45℃にて一晚ハイブリダイズさせた。ナイロンメンブレンの洗浄条件は、0.1% SDS を含む2x SSCで 65℃ 30分間、さらに、0.1 % SDSを含む 1x SSCで65℃ 30分間で行なった。その後BAS2000 (FUJIX)にて、シグナルを検出した。

【0061】

また、PCR法による導入遺伝子の確認は、センスプライマーに上記64F1を、アンチセンスプライマーには上記s64R1を用い、以下の条件で行なった。PCR反応溶液の組成は、ゲノムDNA (100ng/ μ L) 1 μ L, 10 x ExTaq buffer (TaKaRa) 5 μ L, ExTaq付属dNTPミクスチャー 4 μ L, プライマー64F1 (10 μ mole/L) 1 μ L, プライマーs64R1 (10 μ mole/L) 1 μ L, ExTaq (5 units/ μ L, TaKaRa) 0.5 μ L, H₂O 37.5 μ Lとした。サイクル反応は、94° Cで5分後、94° C 15秒、57° C 30秒、72° C 30秒を35サイクル、72° Cで7分処理後、4° C保存とした。増幅された産物を電気泳動し、約1.5kbのバンドの有無により行った。

【0062】

上記方法により、66例の産仔のうち、3例がsgp64遺伝子が導入されたTgm (DNAフラグメントを注入して得られたTgmをFounderと以下記載) であることが確認された (表1)。この3匹のFounderは1匹が雄で2匹が雌であった。

【0063】

【表1】

	生存卵数/注入卵数	移植数	着床数	産仔数(雌, 雄)	離乳数(雌, 雄)	Founder
1st	120/133	114	61	29 (15, 14)	28 (14, 14)	0
2nd	78/88	76	22	4 (2, 2)	4 (2, 2)	0
3rd	102/111	101	55	12 (7, 5)	11 (7, 4)	雌1, 雄1
4th	130/165	126	64	21 (11, 10)	15 (8, 7)	雌1
Total	430/497	417	202	66 (35, 31)	58 (31, 27)	雌2, 雄1

【0064】

得られたfounderは8週齢になった時点で、BALB/cAマウスと交配させた。具体的には、上記3匹Founderの内、雄Founder (ライン番号41) と5例の雌との交配により26匹の産仔が得られ、これら産仔の内12匹がTgm (F1マウス) であった。残りの2匹の雌Founder (ライン番号36および51) からは、それぞれ16匹、15匹の産仔が得られ、Tgm (F1マウス、雌雄含む) はそれぞれ9匹、8匹であり、雄Tgmはそれぞれ4匹、1匹であった (表2)。

【0065】

【表2】

ライン番号	性別	産次回数	産仔数	Tgm (F1) 数
36	雌	2	雌7 雄9	雌5 雄4
41	雄	5	雌11 雄15	雌4 雄8
51	雌	2	雌8 雄7	雌7 雄1

【0066】

【実施例3】 雄Tgmの繁殖能

実施例2において得られた雄Tgm (F1マウス)の繁殖能を調べた。繁殖能は 雄sgp64Tgm (F1マウス)が8週齢になった時点で、BALB/cAマウスと交配させ、その産仔の有無、数を確認することにより行った。

【0067】

3ラインのFounderからそれぞれ得られた雄Tgm (F1マウス) (各一匹)と2例の雌との交配により、それぞれ9匹(雌5、雄4)、9匹(雌2、雄7)、10匹(雌6、雄4)の産仔が得られ、これらの内Tgmは、それぞれ9匹(雌5、雄4)、8匹(雌2、雄6)、5匹(雌4、雄1)であり(表3)、3ラインいずれの雄Tgmにおいても、正常な繁殖能を有していることが確認できた。

【0068】

sgp64雄Tgm (F1マウス)の繁殖成績

【表3】

ライン番号	産次回数	産仔数	Tgm 数
36	2	雌5 雄4	雌5 雄4
41	2	雌2 雄7	雌2 雄6
51	2	雌6 雄4	雌4 雄1

【0069】

【実施例4】 ウエスタンブロット法によるgp64に対するトレランスの確認

sgp64Tgmに出芽バキュロウイルス (pepT1-AcMNPV (pepT1-BV)) を以下の通り免疫し、gp64に対するトレランス誘導の有無を確認した。

免疫はフロイント完全アジュバント (Difco) と不完全アジュバント (Difco) を用いて常法に従ってエマルジョンを作製し、皮下投与する事により行った。初回免疫量は1mg/匹で、2回免疫量は0.5mg/匹で行った。また2回免疫は初回免疫から14日後に行った。初回免疫から17日後に眼窩採血を行い、血清を採取した。コントロールとして、非トランスジェニックマウスに対しても同様に免疫およびその後の血清採取を行った。

【0070】

Tgmにおけるgp64に対するトレランスを確認するために以下のウエスタンブロット解析を行った。

抗原に用いたpepT1-BVを、12%ゲルを用い1 μ g/レーンで還元条件下SDS-PAGEを行った。泳動後PVDF膜にエレクトロブロットした。この膜に、上記において採取した血清を1/1000希釈し、反応させた後、PBS-T (0.05% Tween20含有PBS)を用いて、室温で5分間の洗浄を3回行なった。洗浄後、1/1000希釈したBiotin-Anti-Mouse IgG(γ) (Zymed)とStreptavidin-Alkaline Phosphatase (Zymed)を反応させた。発色はアルカリホスファターゼ染色キット (ナカライ)を用いて行った。

【0071】

Anti-Mouse IgGによる染色では非トランスジェニックマウス (non-Tgm) では3匹とも強く染色されていた(図3)。一方、sgp64Tgmではgp64が、ほとんど染まらず、sgp64Tgmにおいて、gp64に対するトレランス誘導を確認することができた。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 2 】

【図 1】 実施例で用いた可溶型 gp64 遺伝子の塩基配列を示す図である。

【図 2】 pCAG-sgp64 ベクターの模式的な地図を示す図である。

【図 3】 Anti-Mouse IgG を用いたウエスタンブロット解析により、sgp64Tgm において gp64 に対する免疫寛容が誘導されていることを確認した結果を示す写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Non human animals for preparing antibodies, a method and a system for preparing antibodies by using them

<130> C1-A0326

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1539

<212> DNA

<213> Baculovirus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1539)

<223>

<400> 1

atg gta agc gct att gtt tta tat gtg ctt ttg gcg gcg gcg gcg cat	48
Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His	
1 5 10 15	

tct gcc ttt gcg gcg gag cac tgc aac gcg caa atg aag acg ggt ccg	96
Ser Ala Phe Ala Ala Glu His Cys Asn Ala Gln Met Lys Thr Gly Pro	
20 25 30	

tac aag att aaa aac ttg gac att acc ccg ccc aag gaa acg ctg caa	144
Tyr Lys Ile Lys Asn Leu Asp Ile Thr Pro Pro Lys Glu Thr Leu Gln	
35 40 45	

aag gac gtg gaa atc acc atc gtg gag acg gac tac aac gaa aac gtg	192
Lys Asp Val Glu Ile Thr Ile Val Glu Thr Asp Tyr Asn Glu Asn Val	
50 55 60	

att atc ggc tac aag ggg tac tac cag gcg tat gcg tac aac ggc ggc	240
Ile Ile Gly Tyr Lys Gly Tyr Tyr Gln Ala Tyr Ala Tyr Asn Gly Gly	
65 70 75 80	

tcg ctg gat ccc aac aca cgc gtc gaa gaa acc atg aaa acg ctg aat	288
Ser Leu Asp Pro Asn Thr Arg Val Glu Glu Thr Met Lys Thr Leu Asn	
85 90 95	

gtg ggc aaa gag gat ttg ctt atg tgg agc atc agg cag cag tgc gag	336
---	-----

Val	Gly	Lys	Glu	Asp	Leu	Leu	Met	Trp	Ser	Ile	Arg	Gln	Gln	Cys	Glu	
			100					105					110			
gtg	ggc	gaa	gag	ctg	atc	gac	cgt	tgg	ggc	agt	gac	agc	gac	gac	tgt	384
Val	Gly	Glu	Glu	Leu	Ile	Asp	Arg	Trp	Gly	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp	Cys	
		115					120					125				
ttt	cgc	gac	aac	gag	ggc	cgc	ggc	cag	tgg	gtc	aaa	ggc	aaa	gag	ttg	432
Phe	Arg	Asp	Asn	Glu	Gly	Arg	Gly	Gln	Trp	Val	Lys	Gly	Lys	Glu	Leu	
	130						135				140					
gtg	aag	cgg	cag	aat	aac	aat	cac	ttt	gcg	cac	cac	acg	tgc	aac	aaa	480
Val	Lys	Arg	Gln	Asn	Asn	Asn	His	Phe	Ala	His	His	Thr	Cys	Asn	Lys	
145					150					155					160	
tcg	tgg	cga	tgc	ggc	att	tcc	act	tcg	aaa	atg	tac	agc	agg	ctc	gag	528
Ser	Trp	Arg	Cys	Gly	Ile	Ser	Thr	Ser	Lys	Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Glu	
			165					170						175		
tgc	cag	gac	gac	acg	gac	gag	tgc	cag	gta	tac	att	ttg	gac	gct	gag	576
Cys	Gln	Asp	Asp	Thr	Asp	Glu	Cys	Gln	Val	Tyr	Ile	Leu	Asp	Ala	Glu	
		180						185				190				
ggc	aac	ccc	atc	aac	gtg	acc	gtg	gac	act	gtg	ctt	cat	cga	gac	ggc	624
Gly	Asn	Pro	Ile	Asn	Val	Thr	Val	Asp	Thr	Val	Leu	His	Arg	Asp	Gly	
	195						200					205				
gtg	agt	atg	att	ctc	aaa	caa	aag	tct	acg	ttc	acc	acg	cgc	caa	ata	672
Val	Ser	Met	Ile	Leu	Lys	Gln	Lys	Ser	Thr	Phe	Thr	Thr	Arg	Gln	Ile	
	210					215					220					
aaa	gct	gcg	tgt	ctg	ctc	att	aaa	gat	gac	aaa	aat	aac	ccc	gag	tcg	720
Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Ile	Lys	Asp	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro	Glu	Ser	
225					230					235					240	
gtg	aca	cgc	gaa	cac	tgt	ttg	att	gac	aat	gat	ata	tat	gat	ctt	tct	768
Val	Thr	Arg	Glu	His	Cys	Leu	Ile	Asp	Asn	Asp	Ile	Tyr	Asp	Leu	Ser	
			245					250						255		
aaa	aac	acg	tgg	aac	tgc	aag	ttt	aac	aga	tgc	att	aaa	cgc	aaa	gtc	816
Lys	Asn	Thr	Trp	Asn	Cys	Lys	Phe	Asn	Arg	Cys	Ile	Lys	Arg	Lys	Val	
		260					265					270				
gag	cac	cga	gtc	aag	aag	cgg	ccg	ccc	act	tgg	cgc	cac	aac	gtt	aga	864
Glu	His	Arg	Val	Lys	Lys	Arg	Pro	Pro	Thr	Trp	Arg	His	Asn	Val	Arg	
		275					280					285				
gcc	aag	tac	aca	gag	gga	gac	act	gcc	acc	aaa	ggc	gac	ctg	atg	cat	912
Ala	Lys	Tyr	Thr	Glu	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Lys	Gly	Asp	Leu	Met	His	
	290					295					300					

att	caa	gag	gag	ctg	atg	tac	gaa	aac	gat	ttg	ctg	aaa	atg	aac	att	960
Ile	Gln	Glu	Glu	Leu	Met	Tyr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Met	Asn	Ile	
305					310					315					320	
gag	ctg	atg	cat	gcg	cac	atc	aac	aag	cta	aac	aat	atg	ctg	cac	gac	1008
Glu	Leu	Met	His	Ala	His	Ile	Asn	Lys	Leu	Asn	Asn	Met	Leu	His	Asp	
				325					330					335		
ctg	ata	gtc	tcc	gtg	gcc	aag	gtg	gac	gag	cgt	ttg	att	ggc	aat	ctc	1056
Leu	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Val	Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	
			340					345					350			
atg	aac	aac	tct	gtt	tct	tca	aca	ttt	ttg	tcg	gac	gac	acg	ttt	ttg	1104
Met	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	
		355					360					365				
ctg	atg	ccg	tgc	acc	aat	ccg	ccg	gca	cac	acc	agt	aat	tgc	tac	aac	1152
Leu	Met	Pro	Cys	Thr	Asn	Pro	Pro	Ala	His	Thr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Asn	
	370					375					380					
aac	agc	atc	tac	aaa	gaa	ggg	cgt	tgg	gtg	gcc	aac	acg	gac	tcg	tcg	1200
Asn	Ser	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Ala	Asn	Thr	Asp	Ser	Ser	
385					390					395					400	
caa	tgc	ata	gat	ttt	agc	aac	tac	aag	gaa	cta	gca	att	gac	gac	gac	1248
Gln	Cys	Ile	Asp	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Glu	Leu	Ala	Ile	Asp	Asp	Asp	
				405					410					415		
gtc	gag	ttt	tgg	atc	ccg	acc	atc	ggc	aac	acg	acc	tat	cac	gac	agt	1296
Val	Glu	Phe	Trp	Ile	Pro	Thr	Ile	Gly	Asn	Thr	Thr	Tyr	His	Asp	Ser	
			420					425					430			
tgg	aaa	gat	gcc	agc	ggc	tgg	tcg	ttt	att	gcc	caa	caa	aaa	agc	aac	1344
Trp	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Trp	Ser	Phe	Ile	Ala	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	
		435					440					445				
ctc	ata	acc	acc	atg	gag	aac	acc	aag	ttt	ggc	ggc	gtc	ggc	acc	agt	1392
Leu	Ile	Thr	Thr	Met	Glu	Asn	Thr	Lys	Phe	Gly	Gly	Val	Gly	Thr	Ser	
	450					455					460					
ctg	agc	gac	atc	act	tcc	atg	gct	gaa	ggc	gaa	ttg	gcc	gct	aaa	ttg	1440
Leu	Ser	Asp	Ile	Thr	Ser	Met	Ala	Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	
465					470				475						480	
act	tcg	ttc	atg	ttt	ggc	cat	gta	gtt	aac	ttt	gta	att	ata	tta	att	1488
Thr	Ser	Phe	Met	Phe	Gly	His	Val	Val	Asn	Phe	Val	Ile	Ile	Leu	Ile	
				485				490						495		
gtg	att	tta	ttt	ttg	tac	tgt	atg	att	aga	aac	cgt	aat	aga	caa	tat	1536

Val	Ile	Leu	Phe	Leu	Tyr	Cys	Met	Ile	Arg	Asn	Arg	Asn	Arg	Gln	Tyr
			500					505					510		

taa	1539
-----	------

<210> 2
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Baculovirus

<400>	2														
Met	Val	Ser	Ala	Ile	Val	Leu	Tyr	Val	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	His
1				5					10					15	
Ser	Ala	Phe	Ala	Ala	Glu	His	Cys	Asn	Ala	Gln	Met	Lys	Thr	Gly	Pro
			20					25					30		
Tyr	Lys	Ile	Lys	Asn	Leu	Asp	Ile	Thr	Pro	Pro	Lys	Glu	Thr	Leu	Gln
		35					40					45			
Lys	Asp	Val	Glu	Ile	Thr	Ile	Val	Glu	Thr	Asp	Tyr	Asn	Glu	Asn	Val
	50					55					60				
Ile	Ile	Gly	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Ala	Tyr	Ala	Tyr	Asn	Gly	Gly
65					70				75						80
Ser	Leu	Asp	Pro	Asn	Thr	Arg	Val	Glu	Glu	Thr	Met	Lys	Thr	Leu	Asn
				85					90					95	
Val	Gly	Lys	Glu	Asp	Leu	Leu	Met	Trp	Ser	Ile	Arg	Gln	Gln	Cys	Glu
			100					105					110		
Val	Gly	Glu	Glu	Leu	Ile	Asp	Arg	Trp	Gly	Ser	Asp	Ser	Asp	Asp	Cys
		115					120					125			
Phe	Arg	Asp	Asn	Glu	Gly	Arg	Gly	Gln	Trp	Val	Lys	Gly	Lys	Glu	Leu
	130					135					140				
Val	Lys	Arg	Gln	Asn	Asn	Asn	His	Phe	Ala	His	His	Thr	Cys	Asn	Lys
145					150				155						160
Ser	Trp	Arg	Cys	Gly	Ile	Ser	Thr	Ser	Lys	Met	Tyr	Ser	Arg	Leu	Glu
				165					170					175	
Cys	Gln	Asp	Asp	Thr	Asp	Glu	Cys	Gln	Val	Tyr	Ile	Leu	Asp	Ala	Glu
			180					185					190		
Gly	Asn	Pro	Ile	Asn	Val	Thr	Val	Asp	Thr	Val	Leu	His	Arg	Asp	Gly
		195					200					205			

Val	Ser	Met	Ile	Leu	Lys	Gln	Lys	Ser	Thr	Phe	Thr	Thr	Arg	Gln	Ile	210	215	220	
Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Ile	Lys	Asp	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro	Glu	Ser	225	230	235	240
Val	Thr	Arg	Glu	His	Cys	Leu	Ile	Asp	Asn	Asp	Ile	Tyr	Asp	Leu	Ser	245	250	255	
Lys	Asn	Thr	Trp	Asn	Cys	Lys	Phe	Asn	Arg	Cys	Ile	Lys	Arg	Lys	Val	260	265	270	
Glu	His	Arg	Val	Lys	Lys	Arg	Pro	Pro	Thr	Trp	Arg	His	Asn	Val	Arg	275	280	285	
Ala	Lys	Tyr	Thr	Glu	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Lys	Gly	Asp	Leu	Met	His	290	295	300	
Ile	Gln	Glu	Glu	Leu	Met	Tyr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Met	Asn	Ile	305	310	315	320
Glu	Leu	Met	His	Ala	His	Ile	Asn	Lys	Leu	Asn	Asn	Met	Leu	His	Asp	325	330	335	
Leu	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Val	Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	340	345	350	
Met	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	355	360	365	
Leu	Met	Pro	Cys	Thr	Asn	Pro	Pro	Ala	His	Thr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Asn	370	375	380	
Asn	Ser	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Ala	Asn	Thr	Asp	Ser	Ser	385	390	395	400
Gln	Cys	Ile	Asp	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Glu	Leu	Ala	Ile	Asp	Asp	Asp	405	410	415	
Val	Glu	Phe	Trp	Ile	Pro	Thr	Ile	Gly	Asn	Thr	Thr	Tyr	His	Asp	Ser	420	425	430	
Trp	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Trp	Ser	Phe	Ile	Ala	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	435	440	445	
Leu	Ile	Thr	Thr	Met	Glu	Asn	Thr	Lys	Phe	Gly	Gly	Val	Gly	Thr	Ser	450	455	460	
Leu	Ser	Asp	Ile	Thr	Ser	Met	Ala	Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu				

465 470 475 480

Thr Ser Phe Met Phe Gly His Val Val Asn Phe Val Ile Ile Leu Ile
 485 490 495

Val Ile Leu Phe Leu Tyr Cys Met Ile Arg Asn Arg Asn Arg Gln Tyr
 500 505 510

<210> 3
<211> 1464
<212> DNA
<213> Baculovirus

115	120	125	
ttt cgc gac aac gag ggc cgc ggc cag tgg gtc aaa ggc aaa gag ttg			432
Phe Arg Asp Asn Glu Gly Arg Gly Gln Trp Val Lys Gly Lys Glu Leu			
130	135	140	
gtg aag cgg cag aat aac aat cac ttt gcg cac cac acg tgc aac aaa			480
Val Lys Arg Gln Asn Asn Asn His Phe Ala His His Thr Cys Asn Lys			
145	150	155	160
tcg tgg cga tgc ggc att tcc act tcg aaa atg tac agc agg ctc gag			528
Ser Trp Arg Cys Gly Ile Ser Thr Ser Lys Met Tyr Ser Arg Leu Glu			
	165	170	175
tgc cag gac gac acg gac gag tgc cag gta tac att ttg gac gct gag			576
Cys Gln Asp Asp Thr Asp Glu Cys Gln Val Tyr Ile Leu Asp Ala Glu			
	180	185	190
ggc aac ccc atc aac gtg acc gtg gac act gtg ctt cat cga gac ggc			624
Gly Asn Pro Ile Asn Val Thr Val Asp Thr Val Leu His Arg Asp Gly			
	195	200	205
gtg agt atg att ctc aaa caa aag tct acg ttc acc acg cgc caa ata			672
Val Ser Met Ile Leu Lys Gln Lys Ser Thr Phe Thr Thr Arg Gln Ile			
	210	215	220
aaa gct gcg tgt ctg ctc att aaa gat gac aaa aat aac ccc gag tcg			720
Lys Ala Ala Cys Leu Leu Ile Lys Asp Asp Lys Asn Asn Pro Glu Ser			
225	230	235	240
gtg aca cgc gaa cac tgt ttg att gac aat gat ata tat gat ctt tct			768
Val Thr Arg Glu His Cys Leu Ile Asp Asn Asp Ile Tyr Asp Leu Ser			
	245	250	255
aaa aac acg tgg aac tgc aag ttt aac aga tgc att aaa cgc aaa gtc			816
Lys Asn Thr Trp Asn Cys Lys Phe Asn Arg Cys Ile Lys Arg Lys Val			
	260	265	270
gag cac cga gtc aag aag cgg ccg ccc act tgg cgc cac aac gtt aga			864
Glu His Arg Val Lys Lys Arg Pro Pro Thr Trp Arg His Asn Val Arg			
	275	280	285
gcc aag tac aca gag gga gac act gcc acc aaa ggc gac ctg atg cat			912
Ala Lys Tyr Thr Glu Gly Asp Thr Ala Thr Lys Gly Asp Leu Met His			
	290	295	300
att caa gag gag ctg atg tac gaa aac gat ttg ctg aaa atg aac att			960
Ile Gln Glu Glu Leu Met Tyr Glu Asn Asp Leu Leu Lys Met Asn Ile			
305	310	315	320

gag	ctg	atg	cat	gcg	cac	atc	aac	aag	cta	aac	aat	atg	ctg	cac	gac	1008
Glu	Leu	Met	His	Ala	His	Ile	Asn	Lys	Leu	Asn	Asn	Met	Leu	His	Asp	
				325					330					335		
ctg	ata	gtc	tcc	gtg	gcc	aag	gtg	gac	gag	cgt	ttg	att	ggc	aat	ctc	1056
Leu	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Val	Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	
			340					345					350			
atg	aac	aac	tct	gtt	tct	tca	aca	ttt	ttg	tcg	gac	gac	acg	ttt	ttg	1104
Met	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	
		355					360					365				
ctg	atg	ccg	tgc	acc	aat	ccg	ccg	gca	cac	acc	agt	aat	tgc	tac	aac	1152
Leu	Met	Pro	Cys	Thr	Asn	Pro	Pro	Ala	His	Thr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Asn	
	370					375					380					
aac	agc	atc	tac	aaa	gaa	ggg	cgt	tgg	gtg	gcc	aac	acg	gac	tcg	tcg	1200
Asn	Ser	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Ala	Asn	Thr	Asp	Ser	Ser	
385					390					395					400	
caa	tgc	ata	gat	ttt	agc	aac	tac	aag	gaa	cta	gca	att	gac	gac	gac	1248
Gln	Cys	Ile	Asp	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Glu	Leu	Ala	Ile	Asp	Asp	Asp	
				405					410					415		
gtc	gag	ttt	tgg	atc	ccg	acc	atc	ggc	aac	acg	acc	tat	cac	gac	agt	1296
Val	Glu	Phe	Trp	Ile	Pro	Thr	Ile	Gly	Asn	Thr	Thr	Tyr	His	Asp	Ser	
			420					425					430			
tgg	aaa	gat	gcc	agc	ggc	tgg	tcg	ttt	att	gcc	caa	caa	aaa	agc	aac	1344
Trp	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Trp	Ser	Phe	Ile	Ala	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	
		435					440					445				
ctc	ata	acc	acc	atg	gag	aac	acc	aag	ttt	ggc	ggc	gtc	ggc	acc	agt	1392
Leu	Ile	Thr	Thr	Met	Glu	Asn	Thr	Lys	Phe	Gly	Gly	Val	Gly	Thr	Ser	
	450					455					460					
ctg	agc	gac	atc	act	tcc	atg	gct	gaa	ggc	gaa	ttg	gcc	gct	aaa	ttg	1440
Leu	Ser	Asp	Ile	Thr	Ser	Met	Ala	Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	
465					470					475					480	
act	tcg	ttc	atg	ttt	ggc	cat	gta									1464
Thr	Ser	Phe	Met	Phe	Gly	His	Val									
				485												

<210> 4
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> Baculovirus

<400> 4

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His
1 5 10 15

Ser Ala Phe Ala Ala Glu His Cys Asn Ala Gln Met Lys Thr Gly Pro
20 25 30

Tyr Lys Ile Lys Asn Leu Asp Ile Thr Pro Pro Lys Glu Thr Leu Gln
35 40 45

Lys Asp Val Glu Ile Thr Ile Val Glu Thr Asp Tyr Asn Glu Asn Val
50 55 60

Ile Ile Gly Tyr Lys Gly Tyr Tyr Gln Ala Tyr Ala Tyr Asn Gly Gly
65 70 75 80

Ser Leu Asp Pro Asn Thr Arg Val Glu Glu Thr Met Lys Thr Leu Asn
85 90 95

Val Gly Lys Glu Asp Leu Leu Met Trp Ser Ile Arg Gln Gln Cys Glu
100 105 110

Val Gly Glu Glu Leu Ile Asp Arg Trp Gly Ser Asp Ser Asp Asp Cys
115 120 125

Phe Arg Asp Asn Glu Gly Arg Gly Gln Trp Val Lys Gly Lys Glu Leu
130 135 140

Val Lys Arg Gln Asn Asn Asn His Phe Ala His His Thr Cys Asn Lys
145 150 155 160

Ser Trp Arg Cys Gly Ile Ser Thr Ser Lys Met Tyr Ser Arg Leu Glu
165 170 175

Cys Gln Asp Asp Thr Asp Glu Cys Gln Val Tyr Ile Leu Asp Ala Glu
180 185 190

Gly Asn Pro Ile Asn Val Thr Val Asp Thr Val Leu His Arg Asp Gly
195 200 205

Val Ser Met Ile Leu Lys Gln Lys Ser Thr Phe Thr Thr Arg Gln Ile
210 215 220

Lys Ala Ala Cys Leu Leu Ile Lys Asp Asp Lys Asn Asn Pro Glu Ser
225 230 235 240

Val Thr Arg Glu His Cys Leu Ile Asp Asn Asp Ile Tyr Asp Leu Ser
245 250 255

Lys Asn Thr Trp Asn Cys Lys Phe Asn Arg Cys Ile Lys Arg Lys Val

260

265

270

Glu	His	Arg	Val	Lys	Lys	Arg	Pro	Pro	Thr	Trp	Arg	His	Asn	Val	Arg	
		275					280					285				
Ala	Lys	Tyr	Thr	Glu	Gly	Asp	Thr	Ala	Thr	Lys	Gly	Asp	Leu	Met	His	
	290					295					300					
Ile	Gln	Glu	Glu	Leu	Met	Tyr	Glu	Asn	Asp	Leu	Leu	Lys	Met	Asn	Ile	
305					310					315					320	
Glu	Leu	Met	His	Ala	His	Ile	Asn	Lys	Leu	Asn	Asn	Met	Leu	His	Asp	
				325					330					335		
Leu	Ile	Val	Ser	Val	Ala	Lys	Val	Asp	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	
		340						345					350			
Met	Asn	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Thr	Phe	Leu	
	355						360					365				
Leu	Met	Pro	Cys	Thr	Asn	Pro	Pro	Ala	His	Thr	Ser	Asn	Cys	Tyr	Asn	
	370					375					380					
Asn	Ser	Ile	Tyr	Lys	Glu	Gly	Arg	Trp	Val	Ala	Asn	Thr	Asp	Ser	Ser	
385					390					395					400	
Gln	Cys	Ile	Asp	Phe	Ser	Asn	Tyr	Lys	Glu	Leu	Ala	Ile	Asp	Asp	Asp	
				405					410					415		
Val	Glu	Phe	Trp	Ile	Pro	Thr	Ile	Gly	Asn	Thr	Thr	Tyr	His	Asp	Ser	
		420						425					430			
Trp	Lys	Asp	Ala	Ser	Gly	Trp	Ser	Phe	Ile	Ala	Gln	Gln	Lys	Ser	Asn	
		435					440					445				
Leu	Ile	Thr	Thr	Met	Glu	Asn	Thr	Lys	Phe	Gly	Gly	Val	Gly	Thr	Ser	
	450					455					460					
Leu	Ser	Asp	Ile	Thr	Ser	Met	Ala	Glu	Gly	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	
465					470					475					480	
Thr	Ser	Phe	Met	Phe	Gly	His	Val									
				485												

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 5
gaattccacc atggtaagcg ctattggt 28

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 6
gaattctcat tatacatgac caaacatgaa cga 33

<210> 7
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

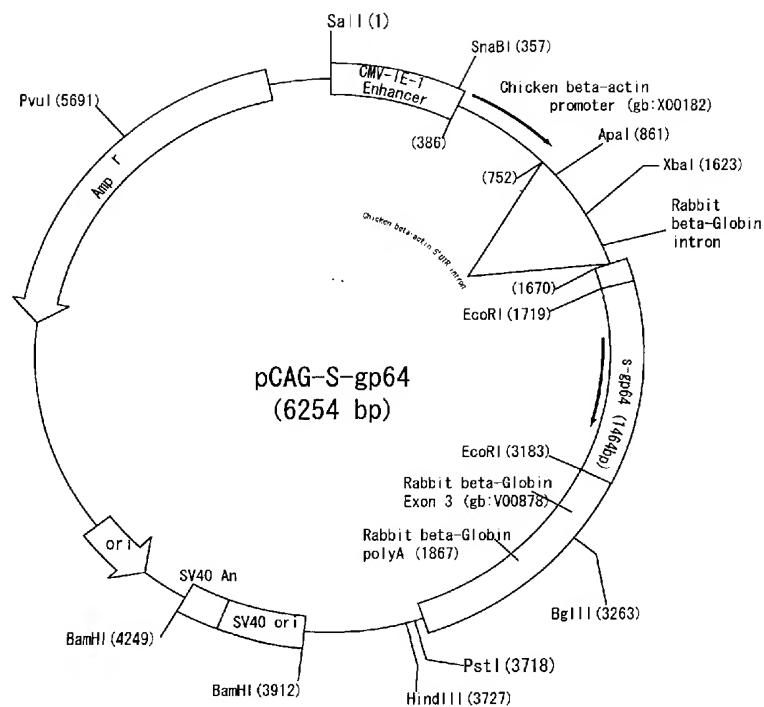
<400> 7
taatacgact cactata 17

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

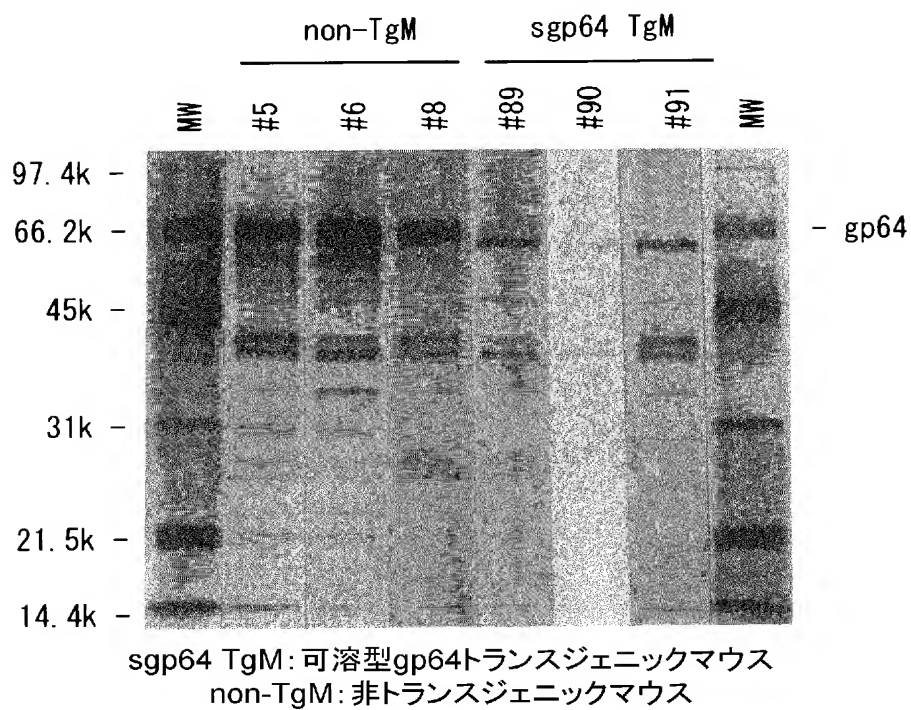
<220>
<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8
catacgattt aggtgacact atag 24

【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫原に含まれる標的抗原以外の膜蛋白質に対して免疫寛容が誘導され、かつ、雄の繁殖能欠損などの好ましくない表現型を持たない免疫動物を提供する。

【解決手段】 背景抗原である膜蛋白質を可溶型とし、これをコードする遺伝子を用いてトランスジェニック動物を作製した。このトランスジェニック動物では、免疫原中に含まれる背景抗原の膜蛋白質に対する抗体が見られず、可溶型蛋白質をコードする遺伝子を用いても全長の膜蛋白質に対する免疫寛容が誘導することができた。その上、トランスジェニック動物の生体内で背景抗原の膜蛋白質を可溶型蛋白質として発現させることにより、膜蛋白質全長を発現させた場合の好ましくない表現型の出現を回避することができ、広く免疫動物として利用可能にすることができた。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 C1-A0326
【提出日】 平成16年11月 5日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2004-107669
【補正をする者】
 【識別番号】 000003311
 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【手続補正1】
 【補正対象書類名】 特許願
 【補正対象項目名】 国等の委託研究の成果に係る記載事項
 【補正方法】 追加
 【補正の内容】
 【国等の委託研究の成果に係る記載事項】 国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成15年度 新エネルギー・産業技術総合開発機構 タンパク質相互作用解析ナノバイオチッププロジェクト委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの）

職権訂正履歴（職権訂正）

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 － 1 0 7 6 6 9
受付番号	5 0 4 0 1 8 8 9 1 9 9
書類名	手続補正書
担当官	清野 俊介 6 9 9 7
作成日	平成 1 6 年 1 1 月 1 8 日

<訂正内容 1>

訂正ドキュメント

書誌

訂正原因

職権による訂正

訂正メモ

【手続補正1】の「【補正対象項目名】の欄」及び「【補正の内容】の欄中の【その他】の項名」を訂正。

訂正前内容

【補正対象項目名】 その他

【補正の内容】

【その他】

訂正後内容

【補正対象項目名】 国等の委託研究の成果に係る記載事項

【補正の内容】

【国等の委託研究の成果に係る記載事項】

出願人履歴

0 0 0 0 0 3 3 1 1

19900905

新規登録

5 9 6 0 5 8 8 8 9

東京都北区浮間5丁目5番1号

中外製薬株式会社